



⑩ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 199 03 693 A 1

⑪ Int. Cl. 6:
C 12 N 9/48
C 12 N 9/96
C 12 Q 1/56
A 61 K 38/48

⑪ Aktenzeichen: 199 03 693.4
⑪ Anmeldetag: 20. 3. 99
⑪ Offenlegungstag: 28. 10. 99

DE 199 03 693 A 1

⑯ Innere Priorität:

| | |
|---------------|------------|
| 198 18 495. 6 | 24. 04. 98 |
| 198 27 734. 2 | 22. 06. 98 |
| 198 51 332. 1 | 06. 11. 98 |
| 198 51 336. 4 | 06. 11. 98 |
| 198 51 335. 6 | 06. 11. 98 |

⑰ Erfinder:

Römisch, Jürgen, Dr., 35041 Marburg, DE; Feußner, Annette, 35043 Marburg, DE; Stöhr, Hans-Arnold, 35083 Wetter, DE

⑲ Anmelder:

Centeon Pharma GmbH, 35037 Marburg, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

④ Protease zur Aktivierung des Gerinnungsfaktors VII

- ⑤ Es wird eine Protease zur Aktivierung des Blutgerinnungsfaktor VII beschrieben, die
 a) durch Anwesenheit von Apratinin gehemmt wird,
 b) durch Calcium-ionen und/oder Heparin oder heparin-verwandte Substanzen in ihrer Aktivität gesteigert wird und
 c) in der SDS-PAGE bei anschließender Färbung im nicht-reduzierten Zustand eine oder mehrere Bänder im Molekulargewichtsbereich von 50-75 kDa und im reduzierten Zustand eine Bande bei 40-55 kDa und eine oder mehrere Bänder im Molekulargewichtsbereich von 10-35 kDa aufweist.

Schließlich werden pharmazeutische Zubereitungen beschrieben, die zur ...

Es wird auch das Proenzym dieser Protease charakterisiert.

Außerdem wird ein Verfahren zur Gewinnung dieser Protease und ihre Verwendung in der Blutungsprophylaxe oder Blutungsstillung beschrieben. Es werden weiterhin ein stabilisiertes Faktor V- und ein stabilisiertes Faktor VIII-Präparat beschrieben, die von den durch proteolytischen Abbau entstehenden, inaktiven Faktor VIII-Fragmenten durch die Inhibition der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease frei sind. Darüber hinaus wird ein Testsystem zum qualitativen und quantitativen Nachweis einer Protease, die den Blutgerinnungsfaktor VII aktiviert, beschrieben, bei dem die Protease bestimmt wird durch Ihre

- a) die Blutgerinnungsfaktoren VIII/VIIa oder V/Va inaktivierende Wirkung oder
- b) die Blutgerinnungszeiten verkürzende Wirkung in globalen Gerinnungstests oder
- c) Plasminogen-Aktivatoren aktivierende Wirkung.

DE 199 03 693 A 1

Beschreibung

Gegenstand der Erfindung ist eine Protease zur Aktivierung des Blutgerinnungsfaktors VII, ein Verfahren zu ihrer Gewinnung, zu ihrem Nachweis und zu ihrer Inaktivierung sowie Arzneizubereitungen, die diese Protease enthalten.

- 5 Das Blutgerinnungssystem umfaßt zwei unterschiedliche, kaskadenförmige Aktivierungswege von im Plasma anwesenden Gerinnungsfaktoren. Je nach auslösendem Mechanismus dient bevorzugt der endogene oder der exogene Weg zur Initiation der Gerinnung.

Bei einer Gewebeverletzung wird als Starter des exogenen Gerinnungsweges das Thromboplastin (Issue Factor, TF mit Phospholipiden) von den betroffenen Zellen exponiert. Das membranständige Thromboplastin kann sowohl Gerinnungsfaktor VII (FVII) als auch zirkulierenden, aktivierte FVII (FVIIa) binden. Dieser TF-FVIIa-Komplex führt in Gegenwart von Calcium-Ionen und Lipiden zur Bindung des FX, der durch limitierte Proteolyse in seine aktivierte Form (FXa) überführt wird. FXa wiederum führt durch Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin zur Bildung von Fibrin und damit letztendlich zum Wundverschluß.

10 Die weitere Aktivierung des an das Thromboplastin gebundenen FVII vollzieht sich anfangs vor allem autokatalytisch, wird aber nach der Initiation der Gerinnungskaskade vor allem durch FXa und Thrombin unterstützt, was zu einer deutlichen Verstärkung der Reaktionskaskade führt.

15 In bestimmten klinischen Situationen ist die Applikation von FVIIa oder FVIIa-enthaltenden Konzentratren indiziert. Bei Patienten, die bspw. unter Hämophilie A leiden und als Folge der Verabreichung von FVIII Antikörper gegen FVIII entwickelt haben, wird die sogenannte "FVIII bypassing activity" (FEIBA) des FVIIa genutzt. Dabei ist nach den bisherigen Befunden FVIIa gut verträglich und führt zu keiner Thromboseneigung, eignet sich aber dazu, die Gerinnung in einem begrenzten aber ausreichenden Umfang zu gewährleisten. Rekombinanter FVIIa wird bereits therapeutisch und prophylaktisch verwendet. Aus Blutplasma gewonnener FVII kann ebenfalls aktiviert und danach verwendet werden. Zu dieser Aktivierung können Proteasen wie Thrombin verwendet werden, die aber als solche die Gerinnung selbst stark aktivieren und zu einer Thrombosegefährdung führen können. Deshalb ist eine anschließende Entfernung oder Inaktivierung von Thrombin erforderlich und führt zu Ausbeuteverlusten. Die Anwendung von FXa oder FIIa (Thrombin) ist wegen der damit verbundenen Thrombosegefährdung häufig kontraindiziert und nur in Notfällen, z. B. bei extremen Blutverlusten und nicht stillbaren Blutungen angezeigt.

20 FVIIa wird in sehr geringen Konzentrationen im Plasma gesunder Menschen gefunden. Über die Bildung und Herkunft des im Blut zirkulierenden FVIIa ist bisher nur sehr wenig bekannt. Spuren von exprimiertem oder bei einer Zellzerstörung freigesetztem Thromboplastin könnten dabei eine Rolle spielen. Obwohl bekannt ist, daß z. B. Faktor XIIa unter bestimmten Bedingungen zu einer FVII-Aktivierung führen kann, ist die physiologische Relevanz dieser Reaktion noch nicht geklärt.

25 Überraschenderweise wurde nun bei der Fraktionierung von Humanplasma und von bestimmten Prothrombinkomplex-Konzentratren eine FVII aktivierende Protease gefunden, die sich von allen bisher bekannten Proteasen unterscheidet. Untersuchungen dieser Protease zeigten, daß sie eine besonders hohe amidolytische Aktivität gegenüber dem Peptid-Substrat S2288 (HD-isoleucyl-L-prolyl-L-arginin-pNA) der Firma Chromogenix AB, Schweden) aufweist. Ein besonderes Merkmal dieser Protease ist, daß die amidolytische Aktivität durch Aprotinin gut gehemmt wird. Auch andere Inhibitoren, wie der Antithrombin III/Heparin-Komplex eignen sich zur Inhibition. Dagegen wird ihre Aktivität durch Heparin und mit dem Heparin verwandte Substanzen wie Heparansulfat oder Dextansulfat und Calcium-Ionen erhöht. 30 Es wurde schließlich gefunden, daß diese Protease in Abhängigkeit von der Zeit und ihrer Konzentration in der Lage ist, den FVII in den FVIIa umzuwandeln. Auch diese Reaktion wird durch Aprotinin inhibiert.

Ein Gegenstand der Erfindung ist deshalb eine Protease zur Aktivierung des Blutgerinnungsfaktors VII, die

- 35 a) durch die Anwesenheit von Aprotinin gehemmt wird,
 b) durch Calcium-Ionen und/oder Heparin oder Heparin-verwandte Substanzen in ihrer Aktivität gesteigert wird und
 c) in der SDS-PAGE bei anschließender Färbung im nicht-reduzierten Zustand eine oder mehrere Banden im Molekulargewichtsbereich von 50–75 kDa und im reduzierten Zustand eine Bande bei 40 bis 55 kDa und eine oder mehrere Banden im Molekulargewichtsbereich von 10 bis 35 kDa aufweist.

40 Im folgenden Text wird die aktivierte Form der Protease als "Protease" bezeichnet, während die nicht-aktivierte Form "Proenzym" genannt wird.

45 Weitere Untersuchungen mit dieser Protease zeigten, daß sie nach Anreicherung oder Isolierung einen raschen Aktivitätsverlust erleidet, der in einer Lösung enthaltend 20 mM Tris, 0,15 M NaCl bei einem pH-Wert von 7,5 beobachtet wurde. Der Zusatz von Albumin in einer Konzentration von 0,1% konnte nicht verhindern, daß nach einer Stunde bei Raumtemperatur die Aktivität der Protease um 50% vermindert war. Dagegen konnte eine sehr gute Stabilisierung der Protease in einer mit 50 mM Na-Citrat auf einem pH-Wert von 6,5 gepufferten Lösung beobachtet werden. Werden der Proteaselösung keine besonderen Stabilisatoren zugesetzt, dann werden keine bzw. nur geringe Wirkungsverluste beobachtet, wenn sie auf einen pH-Wert zwischen 4 und 7,2, bevorzugt auf einen pH-Wert zwischen 5,0 und 7,0 eingestellt ist. 50 Es ist jedoch zweckmäßig Stabilisatoren der Lösung zuzusetzen, wobei neben Citrat vor allem Glutamat, Aminosäuren wie Arginin, Glycin oder Lysin, Calcium-Ionen und Zucker wie Glukose, Arabinose oder Mannose in Mengen von 1–200 mM/l, bevorzugt in Mengen von 5–100 mM/l in Betracht kommen. Eine gute Stabilisierung wurde auch durch den Zusatz von Glykolen wie Ethylenglykol oder von Glycerin erreicht, wobei Mengen von 5–80 Gew.-%, vorzugsweise von 10–60 Gew.-% angewendet werden. Der pH-Wert der stabilisierten Lösung soll dann zwischen den pH-Werten 4–9 liegen.

55 Die erfindungsgemäße Protease sowie das Proenzym können nach gentechnologischen Verfahren, vor allem aber durch Fraktionierung von Blutplasma oder von Prothrombinkomplex (PPSB)-Konzentratren gewonnen werden. Dabei wird das Ausgangsmaterial zunächst einer Anionenaustauscher-Chromatographie unterworfen, an die sich eine Affinität-

DE 199 03 693 A 1

schromatographie des Eluates anschließt. Für die Affinitätschromatographie eignet sich besonders ein auf einer Matrix immobilisiertes Heparin oder eine mit dem Heparin verwandte Substanz wie Heparansulfat oder Dextransulfat. Mit einem derartigen chromatographischen Verfahren kann die erfindungsgemäße Protease und/oder das Proenzym selektiv gebunden und anschließend nach bekannten Verfahren wieder eluiert werden. Zur Kopplung des Liganden an die Matrix empfiehlt sich der Einsatz eines "Spacers". Für die Gewinnung der erfindungsgemäßen Protease hat sich eine Heparin-Lysin-Matrix als besonders geeignet gezeigt.

Die nach diesem Verfahren isolierte Protease zeigt in der SDS-PAGE und anschließender Färbung im nicht reduzierten Zustand eine bis mehrere eng beieinander liegende Banden im Molekulargewichtsbereich von 55–75 kDa. Nach Reduktion beobachtete man eine bis mehrere Banden im Molekulargewichtsbereich von 15–35 kDa und eine Bande bei 40–55 kDa. Eine weitere Bande zwischen 60 und 65 kDa, die nach "Scannen" und quantitativer Auswertung zwischen 5–10% des Gesamtproteins ausmachte, zeigte, dass auch das nicht-aktivierte Proenzym vorhanden war. Dieses Ergebnis wurde durch entsprechende Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern gegen diese Protease unterstützt. Deshalb wird gefolgt, dass auch das Proenzym dieser Protease durch das erfindungsgemäße Verfahren präpariert, pasteurisiert und verwendet werden kann. Ein Gegenstand der Erfindung ist deshalb das Proenzym der Protease zur Aktivierung des Blutgerinnungsfaktors VII. Der Anteil des Proenzymes ist durch die Bande zwischen 60 und 65 kDa gekennzeichnet. Entsprechend der Aminosäuresequenz, die die Aktivierungsregion des Proenzymes ausmacht, kommen als physiologische Aktivatoren des Proenzymes gemäß ihren Substratspezifitäten zum Beispiel Thrombin oder FXIIa in Frage.

Einige der beschriebenen Eigenschaften der erfindungsgemäßen Protease, nämlich ihre Isolierbarkeit aus Plasma oder aus davon abgeleiteten Prothrombinkomplex(PPSB)-Konzentraten, die Hemmung ihrer amidolytischen Aktivität durch Aprotinin und das beschriebene Migrationsverhalten sowohl im reduzierten als auch im nicht-reduzierten Zustand unter SDS-PAGE erinnern an eine von Hunfeld et al. (Ann. Hematol. 1997; 74: A87, 113; Ann. Hematol 1998; 76: A101, P294) isolierte Protease aus einem nicht näher definierten PPSB-Konzentrat. Die Präparation gelang dort im wesentlichen mittels einer Aprotinin-Matrix. Aufgrund der amidolytischen Spaltung von bestimmten Peptidsubstraten wurde die Aktivität als eine Thrombin-ähnliche bezeichnet. Ein Einfluß auf globale Gerinnungsparameter, wie Prothrombinzeit, Quick oder Plättchenaggregation wurde bei Hunfeldt et al. nicht gefunden.

Die N-terminale Sequenzierung der von Hunfeld et al. beschriebenen Protease zeigt Übereinstimmungen mit einem Protein, dessen cDNA von Choi-Miura et al. (J. Biochem. 119: 1157–1165 (1996)) beschrieben wurde. Das korrespondierende Protein zeigt in der Primärstruktur eine Homologie zu einem als "Hepatocyte Growth Factor Activating Enzyme (HGFA)" bezeichneten Enzym.

Bei der N-terminalen Sequenzierung zweier unter reduzierenden Bedingungen aus der SDS-PAGE isolierten Banden wurden folgende Übereinstimmungen festgestellt:

| Molekulargewichtsbereich der Bande | Aminosäuresequenz | Autor |
|------------------------------------|-------------------|-------------------|
| 10 - 35 kDa | IYGGFKSTAGK | Römisch et al. |
| 30 kDa | IYGGFKSTAG | Hunfeld et al. |
| 17 kDa | IYGGFKSTAGKH | Choi-Miura et al. |
| 40 - 55 kDa | LLESLDP | Römisch et al. |
| 50 kDa | SLDP | Hunfeld et al. |
| 50 kDa | SLLESLDPWTPD | Choi-Miura et al. |

Übereinstimmungen zeigen sich auch in anderen Testergebnissen wie der Substratspezifität und der Inhibierbarkeit der Aktivität. Trotzdem kann derzeit von einer Identität dieser Proteine noch nicht mit Sicherheit ausgegangen werden. Jedoch ist für die früher untersuchten vorstehend genannten Proteine die Eigenschaft einer FVII-Aktivierung bzw. Aktivierung anderer Faktoren (s. u.) nicht beschrieben worden.

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften kann die erfindungsgemäße Protease diagnostisch und therapeutisch angewendet werden.

1. Testsysteme mit der erfindungsgemäßen Protease

Die erfindungsgemäße Protease kann in Testreagenzien diagnostische Verwendung finden. So lässt sich das Vorliegen des Faktors VII qualitativ und quantitativ im Gerinnungstest durch Zusatz der erfindungsgemäßen Protease feststellen.

Umgekehrt lässt sich das zur Messung der FVII-Aktivierung entwickelte Testsystem auch zur Detektion und Quantifizierung der Protease anwenden. Dazu wird eine die Protease enthaltende Lösung mit einer FVII-haltigen Lösung gemischt und nach einer entsprechenden Inkubationszeit die entstandene Menge an FVIIa quantifiziert. Dies kann zum Beispiel mittels des Staclot® FVIIa-rTF Testes (Stago/Boehringer Mannheim) durchgeführt werden. Nach einer bevorzugten Verfahrensweise wird dieser Test nicht durch die angebotene FVII-Konzentration limitiert. Ist die Proteasemenge in Form des Gesamtproteinanteiles bekannt, der

- in einer reinen Proteasepräparation mittels Kjel-dahl-Verfahren oder mittels eines anderen dem Fachmann geläufigen Proteinassays oder
- mit Hilfe eines Antigentests, zum Beispiel basierend auf spezifischen Antikörpern und einem entsprechenden immunochemischen Bestimmungsverfahren wie ELISA ermittelt werden kann, läßt sich entsprechend die spezifische Aktivität der Proteasepräparation messen.

Überraschenderweise wurde nun bei der weiteren Charakterisierung der Protease eine Eigenschaft gefunden, die eine zusätzliche Bestimmungsmethode ermöglicht. Bei der Inkubation der Blutgerinnungsfaktoren VIII/VIIIa und V/Va mit der genannten Protease und anschließender Quantifizierung wurde deutlich, daß die genannten Gerinnungsfaktoren innerhalb von der Proteasekonzentration und Inkubationsdauer abhängigen Weise inaktiviert werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein neues Testsystem zum qualitativen und quantitativen Nachweis der Protease, die den Blutgerinnungsfaktor VII aktiviert, bei dem die Protease durch ihre die Blutgerinnungsfaktoren VIII/VIIIa oder V/Va inaktivierende Wirkung bestimbar ist. Dieses Testsystem beruht darauf, daß eine die Protease enthaltende Lösung mit dem Faktor VIII/VIIIa oder dem Faktor V/Va inkubiert wird und dann die verbleibende Faktor VIII/VIIIa- oder die verbleibende Faktor V/Va-Menge mittels eines üblichen Aktivitäts-tests gemessen und daraus durch Vergleich mit einer Standardkurve die Proteasemenge quantitativ bestimmt wird. Dabei wird die Inkubation der Proteaseaktivität nach vorgegebenen Zeitschritten durch die limitierte Zugabe von Aprotinin inhibiert, welches den Vorteil hat, dass es in diesen Konzentrationen die anschließenden Messungen des Testsystems nicht beeinflußt. Danach werden dann die restlichen Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren mittels eines dem Fachmann geläufigen Tests gemessen. Besonders bewährt hat sich hierfür ein Testsystem, bei dem der sog. Coamatic® Faktor VIII Test (Chromogenix AB) eingesetzt wird, der im wesentlichen die Faktoren IXa und X enthält, wobei in Gegenwart eines Thrombininhibitors die entstandene Menge an FXa mittels einer Umsetzung eines chromogenen Substrates quantifiziert wird. Diese ist wiederum der FVIII- oder FVIIIa-Menge proportional.

Durch die Bestimmung der FVIII-Restaktivität kann dann auf die vorhandene Proteasekonzentration zurückgeschlossen werden.

Die Degradation des FVIII/FVIIIa oder des FV/FVa durch die proteolytische Einwirkung ist mittels der SDS-PAGE deutlich nachvollziehbar. Abhängig von der Inkubationsdauer der Protease z. B. auf ein FVIII-Konzentrat verschwinden FVIII-typische Banden, während andere neu auftauchen oder schwach vorhandene zunehmen. Dementsprechend läßt sich die Proteaseaktivität auch mit Hilfe der Quantifizierung der abnehmenden oder zunehmenden Banden korrelieren und somit quantitativ z. B. mittels eines Proteasestandards erfassen. Die Änderungen der Bandenintensitäten auf dem SDS-PAGE Elektropherogramm oder nach anderen elektrophoretischen Verfahren läßt sich beispielsweise mit einem dem Fachmann vertrauten "Scanner" samt entsprechendem Programm quantifizieren. Darüber hinaus können Antikörper gegen die genannten Gerinnungsfaktoren zum Western Blotting verwendet und in der beschriebenen Weise zur Evaluierung benutzt werden. Besonders eignen sich Antikörper, die spezifisch die abnehmenden oder vor allem die entstehenden Banden erfassen. Dabei können diese auch zur Etablierung von anderen immunochemischen Tests, wie ELISA, Verwendung finden.

Die für den FVIII/FVIIIa beschriebene proteolytische Inaktivierung wird ebenfalls bei Inkubation der Protease mit dem Faktor V/Va beobachtet, der eine gewisse Strukturhomologie zu FVIII aufweist. In geeigneten Aktivitäts-Testsystemen sowie in der SDS-PAGE/Western Blotting läßt sich die Degradation verfolgen.

Trotz der FV- und FVIII-Inaktivierungen wurde nun gefunden, daß die Zugabe der Protease zu Blut, zu an Plättchen reichem Plasma oder Plasma die Gerinnungszeiten verkürzte, also der prokoagulatorische Effekt in verschiedenen sog. "globalen Gerinnungstests" überwog. Unter diesen Testsystemen versteht man zum Beispiel die nicht-aktivierte partielle Thrombo-plastinzeit (NAPTT), die Prothrombinzeit (PT) und die Rekalifizierungszeit. Da die Verkürzung dieser Zeiten, gemessen zum Beispiel in sog. Koagulometern, mittels Thrombelastographie oder aber in chromogenen Tests, mit der Konzentration einer gerinnungsfördernden Substanz korreliert, kann umgekehrt anhand einer Eichkurve von der Gerinnungszeit auf die Konzentration der Substanz in einer Probe geschlossen werden. Entsprechend läßt sich die Konzentration des "FVII-Aktivators" mit Hilfe von ausgewählten Gerinnungs-Globaltests bestimmen.

Überraschend war ebenfalls der Befund, daß der "FVII-Aktivator" auch eine effektive Aktivierung der Einketten-Urokinase (scuPA, single chain urokinase plasminogen activator) und des Einketten-tPA (scTPA, single chain tissue plasminogen activator) bewirken kann, also als Plasminogenaktivator-Aktivator (PAA) agieren kann. Die Aktivität der aktivierten PAs kann beispielsweise mittels chromogenen Substrate gemessen werden. Diese Eigenschaft kann daher dementsprechend ebenfalls zur Detektion und auch zur Quantifizierung des "FVII-Aktivators" verwendet werden. Die Aktivierung der Plasminogen-Aktivatoren kann in Anwesenheit von Plasminogen in einer gekoppelten Reaktion auch durch die Plasminbildung selbst oder durch die von Plasmin bewirkte Auflösung eines Fibringerinnsels bestimmt werden.

Zusammengefaßt läßt sich also feststellen, daß man die Protease detektieren und auch quantifizieren kann, indem man sie mit einer FVIII- oder FVIIIa-haltigen Lösung inkubiert und danach die restliche FVIII/VIIIa-Menge mittels eines geeigneten Aktivitäts-tests bestimmt. In gleicher Weise kann FV oder FVa mit der Protease inkubiert und danach die restliche FV/FVa-Menge quantifiziert werden. Die unbekannte Proteasekonzentration kann durch Vergleich mit einer mitgeföhrten Standardkurve steigender Proteasemengen quantitativ bestimmt werden. Verschiedene globale Gerinnungstests sind ebenfalls zur Quantifizierung geeignet, indem mit Hilfe der Verkürzung der Gerinnungszeit an einer Eichkurve die Proteasenkonzentration abgelesen wird. Auch die PAA-Aktivität der Protease kann zu Bestimmungszwecken genutzt werden.

Ein weiteres Merkmal dieser Tests ist es, daß sich die FV- und die FVIII-Inaktivierung und die PAA-Aktivität besonders gut in Gegenwart genügend hoher Kalziumkonzentrationen entfaltet, bevorzugt >0,001 mM, besonders bevorzugt >0,005 mM, z. B. in Form von CaCl₂. Im Gegensatz zum direkten chromogenen Assay, in dem, wie vorstehend beschrieben, sowohl Heparin und heparin-ähnliche Substanzen als auch Kalzium die Proteaseaktivität steigern, wird die FV/FVIII-Inaktivierung durch Heparin nicht oder nur unbedeutend gefördert. Dagegen wird die PAA-Aktivität in Gegenwart beider Agentien, also durch Kalzium und/oder Heparin oder heparinähnliche Substanzen, stimuliert.

Die durch die Protease vermittelten Reaktionen lassen sich durch Inkubation der Protease mit Inhibitoren, besonders Antithrombin III in Gegenwart von Heparin oder heparin-ähnlichen Substanzen (bevorzugt in Gegenwart von Heparin, C1-Esterase-Inhibitor, alpha2-Antiplasmin, Inter-alpha-Trypsin-Inhibitor oder bekannten synthetischen, niedermolekularen Protease-Inhibitoren wie das FOIPAN® sehr effektiv verringern oder verhindern. Deshalb kann man diese Substanzen zum Stoppen der Reaktion verwenden, um z. B. Inkubationszeiten exakt zu definieren bzw. die Spezifität des Testes noch zu erhöhen. Auch die Verringerung freier Kalziumionen im Ansatz durch zum Beispiel Chelatbildner ist hierfür verwendbar.

5

2. Stabilisierte Faktor-V- und Faktor VIII-Präparate

Aus den vorstehend beschriebenen Beobachtungen über die proteolytischen Wirkungen der erfundungsgemäßen Protease auf die Gerinnungsfaktoren V und VIII ergab sich nun die weitere Aufgabe, die Protease zu inhibieren oder in ihrer Aktivität zu reduzieren, um Ausbeuteverluste und das Entstehen von eventuell störenden Proteinfragmenten zu vermeiden. Dies gilt umso mehr, als die Herstellung von FV und FVIII meistens aus aus Plasma gewonnenem Kryopräzipitat und in Gegenwart von Kalziumionen erfolgt, weil diese zur Aufrechterhaltung von Protein-Konformationen benötigt werden.

10

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein stabilisiertes FV- oder ein stabilisiertes FVIII-Präparat, das von den durch proteolytischen Abbau entstehenden Faktor V- oder Faktor VIII-Fragmenten frei ist, weil die den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierende Protease inhibiert ist. Da genauere Untersuchungen gezeigt haben, daß die Faktor V- und die Faktor VIII-Inaktivierung durch die genannte Protease besonders effektiv in Gegenwart von Kalziumionenkonzentrationen über 0,5 mM geschieht, kann eine wirksame Stabilisierung des Faktor V oder des VIII-Präparates erreicht werden, wenn zur Inhibition der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease die Konzentrationen an Kalziumionen im Faktor V- oder im Faktor VIII-Präparat auf weniger als 1,0 mM, vorzugsweise auf weniger als 0,5 mM eingestellt werden. Bei diesen Konzentrationen sind die den Faktor V und den Faktor VIII inaktivierenden Eigenschaften der Protease deutlich reduziert, jedoch reicht die Menge der Kalziumionen noch aus, um das FV- und das FVIII Molekül in ihren Konformationen zu stabilisieren. Die vorstehend genannten Mengen an Kalziumionen sollten nicht nur im Endprodukt, sondern schon im Kryopräzipitat und in den sich anschließenden Reinigungsschritten nicht überschritten werden.

15

Entsprechend der oben beschriebenen Affinität der Protease bzw. des Proenzymes zu Heparin und heparin-ähnlichen Substanzen, kann die Protease/das Proenzym durch Inkubation mit immobilisiertem Heparin aus der FVIII- bzw. FV-haltigen Lösung entfernt werden.

20

Zur Verhinderung der proteolytischen Degradation des FV oder des FVIII können jedoch auch natürliche oder synthetische Protease-Inhibitoren, ggf. zusätzlich zu einer Verminderung der Menge an Kalziumionen, eingesetzt werden. Als Inhibitoren können Proteine wie das Aprotinin, das alpha2-Antiplasmin, der C1-Esterase-Inhibitor oder der Inter-Trypsin-Inhibitor eingesetzt werden. Auch niedermolekulare Substanzen, die dem Fachmann als synthetische Serinprotease-Inhibitoren bekannt sind, können hier Verwendung finden. Inhibitoren, deren hemmendes Potential durch Heparin oder Heparinoide erhöht wird, wie das Antithrombin III, können ebenfalls zugesezt werden. Denn es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß Heparin allein zwar die amidolytische Aktivität der Protease gegenüber kleinen chromogenen Substanzen zu steigern vermag, nicht jedoch die FV/FVIII-Inaktivierung unterstützt.

25

3. Die erfundungsgemäße Protease enthaltende Arzneimittel

30

Die neue Protease bzw. deren Proenzym können aber auch therapeutisch angewendet werden.
Sie können als Blutgerinnungsmittel entweder allein oder zusammen mit die Proteaseaktivität erhöhenden Substanzen wie Heparin oder dem Heparin verwandten Substanzen wie Heparansulfat und/oder Calcium-Ionen eingesetzt werden, wobei diesem Mittel zusätzlich auch noch der Faktor VII in seiner inaktiven Form zugesezt sein kann. Die Anwendung eines derartigen Mittels kann z. B. unter Ausnutzung seiner FVIII bypassing activity (FIBBA) angezeigt sein, wenn Unverträglichkeiten gegenüber dem FVIII und/oder FIX und/oder FXI und/oder den Proteinen der Kontaktphase, wie FXII, z. B. wegen des Vorliegens von Antikörpern, bestehen oder andersartigen Mangelsituationen vorliegen. Die Aktivierung des FVII kann dabei entweder in vitro, im Plasma, in angereicherten Fraktionen oder durch Einwirkung auf gereinigte FVII erfolgen. Auch die Anwendung ex vivo zur allgemeinen Blutungsprophylaxe oder zur Stillung von Blutungen kann mit dem erfundungsgemäßen Blutgerinnungsmittel durchgeführt werden.

35

Andererseits kann die festgestellte Inhibition der erfundungsgemäßen Protease durch Aprotinin oder die obengenannten Inhibitoren zur Entwicklung eines einen Proteasehemmer enthaltenden Mittels benutzt werden, welches die Gerinnungsfähigkeit des Blutes vermindert. Darüberhinaus lassen sich mittels der erfundungsgemäßen Protease auch physiologische oder nicht-physiologische Faktoren wie synthetische Peptide ermitteln, die wegen ihrer proteasehemmenden Wirkung die Blutgerinnung beeinträchtigen. Dazu können als strukturelle Grundlage die Peptidsequenzen der besonders effektiv umgesetzten chromogenen Substrate dienen, wie die des S 2288 (im Detail, siehe oben). Der Zusatz von geeigneten Inhibitoren zu Gerinnungspräparaten oder bei deren Präparation kann erforderlich werden, wenn diese frei von proteolytischen Aktivitäten sein sollen.

40

Überraschenderweise wurde nun bei der weiteren Charakterisierung der Protease eine Eigenschaft gefunden, die eine zusätzliche Nutzung der Protease, des sog. "Faktor VII-Aktivators", ermöglicht. Bei der Inkubation von Einketten-Plasminogenaktivatoren wie der Prourokinase (Einketten-Urokinase, scuPA, single chain urokinase plasminogen activator) oder des sctPA (single chain tissue plasminogen activator) bewirkt der "Faktor VII-Aktivator" eine Aktivierung dieser Plasminogenaktivatoren (PA). Dabei findet eine limitierte Proteolyse der Einketten-PAs zur zweikettigen Protease statt, die im besonderen zur Aktivierung des Plasminogens geeignet sind. Das resultierende Plasmin ist der Effektor der Fibrinolyse, also des physiologischen Systems, das für die Auflösung von Thromben zuständig ist. PAs, wie Prourokinase oder tPA sind körpereigene Proteine, die bei Bedarf freigesetzt und bekanntmassen durch Plasmin oder durch Kallikrein (scuPA) aktiviert werden. Die Aktivierung der scuPA im gesunden Zustand ist bisher noch nicht vollständig geklärt.

45

50

55

60

65

DE 199 03 693 A 1

Therapeutisch werden die Plasminogenaktivatoren als isolierte oder rekombinant hergestellte Proteine in pharmazeutischen Zubereitungen bei thromboembolischen Erkrankungen oder Komplikationen eingesetzt, wie bei der Beinvenenthrombose, dem Herzinfarkt oder Schlaganfällen.

- Entsprechend der jetzt aufgefundenen Eigenschaft des "Faktor VII-Aktivators" kann dieser zur endogenen oder exogenen Aktivierung von Plasminogenaktivatoren wie der Plasminogenaktivator oder des sctPAs verwendet werden. Diese Aktivität kann auch durch Anwendung der genannten Protease zur Prophylaxe oder Therapie von thromboembolischen Erkrankungen Anwendung finden, und zwar auch in Kombination mit Einketten- oder Zweiketten-Plasminogenaktivatoren oder Antikoagulanzen. Diese Anwendungsmöglichkeit steht nicht im Widerspruch zu der Tatsache, dass die Protease auch prokoagulatorisch wirken kann. Die Frage, welche der beiden Reaktionen überwiegt, regelt sich wahrscheinlich durch die Verfügbarkeit der physiologischen Substrate. Nach dem derzeitigen Stand des Wissens wird der Faktor VII im Plasma moderat aktiviert und hält ständig eine bestimmte Konzentration an FVIIa aufrecht, um plötzlichen Gefäßverletzungen sofort entgegenwirken zu können. Dagegen findet man beim Tissue-Plasminogenaktivator und beim Urokinase-Plasminogenaktivator nur Nanogramm-Mengen in einem ml Blutplasma. Erst bei Fibrinablagerung oder Thromben erhöht sich die Konzentration an Plasminogenaktivatoren durch Sekretion oder Synthese, die nach Aktivierung lokal, besonders thrombusgebunden, ihre thrombolytische Aktivität durch Plasminogenaktivierung entfalten. In Anwesenheit von Einketten-PAs, besonders lokal begrenzt, könnte deren Aktivierung die FVII-Aktivierung überwiegen, wodurch eine Anpassung an die physiologische Situation möglich ist. Entsprechend könnte diese Protease auch die Hämostase regulieren, wodurch eine Substitution mit der Protease und/oder des Proenzymes bei angeborenen und erworbenen Mangelzuständen angezeigt ist.
- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb eine pharmazeutische Zubereitung, die eine zur Auflösung von fibrinhalftigen Thromben ausreichende Menge der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease und/oder deren Proenzymform enthält. Diese Zubereitung kann außerdem Einketten-Plasminogenaktivatoren (PA) und/oder Antikoagulanzen enthalten.
- Da sich gezeigt hat, dass die Plasminogenaktivatoren verstärkende Wirkung des "FVII-Aktivators" besonders durch Kalzium und/oder Heparin und heparinähnliche Substanzen wie Dextranulfat gefördert wird, können zur erfundungsge- mäßen Auflösung von fibrinhalftigen Thromben besonders vorteilhaft pharmazeutische Zubereitungen eingesetzt werden, die zusätzlich lösliche Kalziumsalze und/oder Heparin oder heparinähnliche Substanzen enthalten. Dabei kann die Protease/das Proenzym allein oder in Kombination mit Einketten- oder Zweiketten-Plasminogenaktivatoren ohne oder mit Substanzen eingesetzt werden, die besondere Affinitäten zu der Protease aufweisen und damit deren Aktivität als Trägersubstanz zur Verlängerung der Plasmahalbwertszeit oder als Vermittler zu Oberflächen erhöhen.
- Aufgrund seiner besonderen fibrinolytischen Wirkung können pharmazeutische Zubereitungen, die die den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierende Protease enthalten, zur Behandlung von Erkrankungen eingesetzt werden, die durch fibrinhaltige Thromben verursacht werden. Auch bei Wundheilungsprozessen spielen fibrinolytische Prozesse eine Rolle. Dabei kann die genannte Protease und/oder das Proenzym intravenös oder lokal, subkutan, intradermal, intramuskulär oder bei Verletzungen und Wunden auch topisch oder gebunden an eine geeignete Trägermatrix erfolgen. Dabei kann nicht nur die aus Körperflüssigkeiten wie Blut oder Plasma gewonnene Protease/Proenzym, sondern auch rekombinant oder transgen hergestellte Protease/Proenzym eingesetzt werden. Auch als Bestandteil eines sog. Fibrinklebers kommt die Protease/Proenzym in Frage, der dann eine die Protease/Proenzym hemmende Substanz, wie Aprotinin, nicht enthalten sollte. Dabei können die gerinnungsverkürzenden Eigenschaften der Protease genutzt werden.

4. Verfahren zur Pasteurisierung der FVII aktivierenden Protease

Als ein aus Humanplasma isoliertes Protein kann die erfundungsgemäße Protease und/oder ihr Proenzym nur dann als pharmazeutische Zubereitung eingesetzt werden, wenn sie vorher einem Verfahren zur Virusinaktivierung unterworfen worden ist. Besonders das Pasteurisierungsverfahren ist als das wichtigste Verfahren zur Virusinaktivierung anerkannt. Eine Erhitzung von bis zu 10 Stunden bei etwa 60°C setzt jedoch eine ausreichende Stabilität des zu behandelnden Proteins voraus. Die optimalen Stabilisatoren müssen für jedes Protein gesondert ermittelt und deren Konzentrationen optimiert werden.

Für die erfundungsgemäße Protease und/oder ihr Proenzym sind bereits vorstehend Bedingungen genannt worden, die das Protein in Lösung stabilisieren, ohne dass eine Pasteurisierung vorgenommen wird. Besonders ein leicht saurer pH-Bereich hat sich diesbezüglich als vorteilhaft herausgestellt. Bei einer Pasteurisierung unter diesen Bedingungen verliert die erfundungsgemäße Protease und/oder ihr Proenzym jedoch in der Regel mehr als 50% ihrer ursprünglichen Aktivität.

Es wurde nun gefunden, dass eine Pasteurisierung einer die erfundungsgemäße Protease und/oder ihr Proenzym enthaltenden pharmazeutischen Zubereitung optimale Stabilisierungserfolge gewährleistet, wenn die Zubereitung

- a) in einem pH-Bereich von 3,5 bis 8,0, vorzugsweise in einem pH-Bereich von 4,0 bis 6,8;
- b) unter Zusatz einer oder mehrerer Aminosäuren in einer Menge von mehr als 0,01 mol/l, vorzugsweise mehr als 0,05 mol/l; und/oder
- c) unter Zusatz eines Zuckers oder einer Kombination verschiedener Zucker mit einer Gesamtkonzentration von mehr als 0,05 g/ml, vorzugsweise mehr als 0,2 g/ml; und/oder
- d) unter Zusatz ein oder mehrerer Substanzen, die Kalziumionen zu komplexieren vermögen, wie Zitrat, Oxalat, Ethyldiamintetraessigsäure usw. hergestellt wird.

Auch Zusätze wie Albumin, Haemaccel®, Heparin und Heparinoide, Glyzerin, Glykol und Polyethylenglykol können separat oder in Mischung Verwendung finden. Nach Beendigung der Pasteurisierung können die als Stabilisatoren zugesetzten Zucker, Aminosäuren und anderen Zusatzstoffe mit dem Fachmann vertrauten Verfahren vermindert oder aus der Zubereitung ganz entfernt werden. Die Ergebnisse der Pasteurisierungsverfahren sind in den Beispielen 12 und 13 enthalten.

DE 199 03 693 A 1

Beispiel 1

Zur Demonstration der Aktivierung von FVII durch die präparierte Protease wurde das Staclot® FVIIa-rTF-Testsystem (Stago/Boehringer Mannheim) verwendet. Dieses Detektionssystem beruht auf der besonderen Eigenschaft des (re-kombinanten) löslichen Tissue Factors (rTF), der ausschließlich den präformierten aktivierten FVII (FVIIa) zur Initiation des exogenen Gerinnungsweges verwenden kann. Damit wird, anders als beim vollständigen Tissue Factor, eine genaue Bestimmung des aktuellen FVIIa Gehaltes möglich.

Für die Aktivierungsexperimente wurde isolierter FVII (Enzyme Research Labs) verwendet. Dieser enthält selbst Spuren FVIIa, da er aus Humanplasma isoliert wird. Die Konzentration wurde durch Verdünnung mit Puffer auf 0,05 IU/ml FVII eingestellt. FVII wurde mit den Testsubstanzen für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf den aktuellen FVIIa-Gehalt getestet. Die FVIIa-Gehalte wurden anhand der parallel erstellten Referenzkurve quantifiziert.

In Vorversuchen, die hier nicht beschrieben werden, wurde ermittelt, daß das Aprotinin in der verwendeten Konzentration die Aktivität der präparierten Protease vollständig inhibitierte, jedoch weder FVIIa direkt noch das FVIIa-rTF Testsystem signifikant beeinflußte.

Die nachfolgenden Ergebnisse beziehen sich jeweils auf Dreifachbestimmungen.
Entsprechend wurden folgende experimentelle Ansätze durchgeführt:

1. FVII

Resultat: 10 mlU/ml FVIIa

Nicht aktiverter FVII diente als Kontrollansatz. Dieser enthält bereits Spuren von FVIIa (siehe oben) in der Größenordnung 10 mlU FVIIa/ml.

2. FVII + Aprotinin

In diesem Ansatz wurde FVII in Anwesenheit von Aprotinin inkubiert und in den FVIIa-rTF Assay eingesetzt, um zu zeigen, daß weder FVIIa selbst inhibiert noch der Test durch das verwendete Aprotinin beeinflußt wurde. Dies wurde bestätigt (im Vergleich zu Ansatz 1).

3. Protease + FVII (Inkubation), danach Zugabe von Aprotinin

Resultat: 18 mlU/ml FVIIa

Der Protease wurde hier Zeit gegeben, um FVIIa zu aktivieren. Erst nach der 10 minütigen Inkubation wurde Aprotinin zugegeben, um die Protease zu inhibieren. Entstandener FVIIa wurde im FVIIa-rTF Assay quantifiziert. Abzüglich des FVIIa Basiswertes (Ansatz 1) sind unter den gewählten Bedingungen also 8 mlU/ml FVIIa durch die Proteaseeinwirkung entstanden.

4. Protease + Aprotinin, danach Zugabe von FVII

Resultat: 11 mlU/ml FVIIa

In diesem Ansatz wurde die Protease vor Kontakt mit FVII mit Aprotinin inhibiert. Weder die anschließende Inkubation mit FVII noch die folgende FVIIa Quantifizierung zeigte einen signifikanten Anstieg des FVIIa-Gehaltes (11 versus 10 mlU/ml in Ansatz 1 ist aufgrund des Assay-Schwankungsbreite als nicht signifikant zu werten).

5. Protease

Resultat: 0 mlU/ml FVIIa

Durch diesen Ansatz wurde demonstriert, daß die Protease in der gewählten Konzentration selbst keinen Einfluß auf das FVIIa-rTP Testsystem zeigte.

Zusammenfassend ergibt sich hieraus, daß

- die beschriebene Protease FVII aktiviert;
- die Aktivierung von FVII durch die Protease "direkt" erfolgt, also unabhängig von der Anwesenheit des rTF;
- die Aktivierung von FVII durch Aprotinin hemmbar ist, Aprotinin selbst das Testsystem in der gewählten Konzentration nicht signifikant beeinflußt.

Beispiel 2

Dieses Beispiel beschreibt, daß die Aktivierung von FVII in einer von der Konzentration der Protease und der Inkubationszeit der Protease mit FVII abhängigen Reaktion erfolgt.

Testsysteme und Reagenzien wurden entsprechend den in Beispiel 1 beschriebenen Bedingungen gewählt. In einer ersten Versuchsserie wurde der vorgelegte FVII mit verschiedenen Verdünnungen (1 : 5, 1 : 10, 1 : 20) der Protease enthaltenden Lösungen vorinkubiert (5 min RT), danach mit Aprotinin versetzt (zur Inhibition der Protease) und anschließend

DE 199 03 693 A 1

im FVIIa-rTF Assay auf den Gehalt an FVIIa geprüft.

Als Kontrollansätze dienten wiederum die Parallelansätze, bei denen die Protease vor Kontakt mit FVII durch Aprotinin inhibiert worden war.

Die Ergebnisse sind als Aktivierungsfaktor angegeben, d. h. entsprechen dem x-fachen dessen, was in dem o.g. Kontrollansatz selbst gemessen wurde:

| | Ansatz | Kontrolle | |
|----|----------------------------------|----------------------|-----|
| 10 | Protease+FVII | Protease+Aprotinin | |
| 15 | Inkubation + Aprotinin | Inkubation + FVII | |
| 20 | Aktivierungsfaktor | | |
| 25 | Verdünnung der Proteaselösung | | |
| 30 | 1 : 5 | 2,6 | 1,0 |
| 35 | 1 : 10 | 2,0 | 1,0 |
| 40 | 1 : 20 | 1,6 | 1,0 |

Der Aktivierungsfaktor 1,0 der Kontrollansätze entspricht der zusätzlich eingeschlossenen Kontrolle, bei der lediglich 35 der Testpuffer mit dem verwendeten FVII unter identischen Inkubationsbedingungen behandelt und getestet wurde. Das heißt, es fand keine signifikante Aktivierung in den Kontrollansätzen statt.

Hieraus ergibt sich, daß die Aktivierung von FVII durch die Protease in einer von der Konzentration der Protease abhängigen Weise erfolgt.

In ähnlicher Weise wurde gezeigt, daß sich die Aktivierung von FVII durch die Protease bei konstant gehaltenen Konzentrationen der Reaktionspartner in einer von der Inkubationsdauer abhängigen Weise vollzieht.

Bei Inkubation gleicher Volumina einer 0,2 lU/ml FVII enthaltenden Lösung mit einer 1 : 10 verdünnten Proteaselösung ergaben sich nach entsprechenden Inkubationszeiten und anschließender Zugabe von Aprotinin (um die Aktivierung zu stoppen) folgende FVIIa-Gehalte:

| Inkubationsdauer | Aktivierungsfaktor |
|------------------|--------------------|
| 0 min | 1,0 |
| 2,5 min | 1,3 |
| 5,0 min | 2,0 |
| 10,0 min | 2,8 |
| 50 40,0 min | > 3,8 |

Hieraus ergibt sich, daß sich die Aktivierung von FVII durch die Protease in einer von der Zeit abhängigen Weise vollzieht.

55 Beispiel 3

Anhand dieses Beispiels soll demonstriert werden, daß die Aktivierung von FVII durch die Protease in Anwesenheit von Calcium-Ionen und Heparin erhöht wird.

60 25 µl der Protease enthaltenden Lösung wurde mit 50 µl

- Puffer (Kontrolle)
- 15 mM CaCl₂
- 50 USP-E Heparin/ml
- 65 - Pathromin (Lipidgemisch, Abfüllung nach Angaben des Herstellers gelöst)

geträufelt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit 150 µl einer Tris/NaCl-Pufferlösung (pH 8,2) und 25 µl des chromogenen Substrates S2288 (3 mM) versetzt und die zeitabhängige Änderung der Extinktion bei 405 nm (bei 37°C) ge-

DE 199 03 693 A 1

messen. Angegeben sind Aktivierungsfaktoren bezogen auf die Puffer-Kontrolle (\times -fach).

| Ansätze | Aktivierungsfaktor (\times -fach Puffer-Kontrolle) | |
|---------------------------------------|--|----|
| Puffer-Kontrolle | 1,0 | 5 |
| + CaCl ₂ | 3,6 | |
| + Heparin | 2,6 | |
| + Lipid | 0,9 | |
| + CaCl ₂ + Heparin | 4,3 | 10 |
| + CaCl ₂ + Lipid | 3,3 | |
| + Heparin + Lipid | 2,7 | |
| + CaCl ₂ + Heparin + Lipid | 3,7 | |

Unter den Bedingungen dieses Beispiels sind deutliche Aktivitätssteigerungen der Protease in Anwesenheit von Calcium-ionen und/oder Heparin zu vermerken. 15

Beispiel 4

Jeweils 25 µl einer Lösung, die 10, 1 oder 0,1 µg/ml der Protease enthielt, wurden mit 25 µl FVIII (2 IU/ml) gemischt und anschließend mit 25 µl CaCl₂ (25 mM) und 25 µl Pathromtin® (Dade Behring GmbH) versetzt. Nach einer Inkubation bei 37°C für 0, 3, 10 und 20 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 400 µl Aprotinin (500 KIE/n-d) gestoppt. Als eine Kontrolle diente ein Ansatz, bei dem Aprotinin vorgelegt wurde.

Jede Probe wurde in Tris-Puffer/BSA verdünnt. Je 50 µl dieser Lösung wurden mit 50 µl des Faktorenreagenzes (im Wesentlichen bestehend aus FIXa, FX und einem Thrombininhibitor, entsprechend modifiziert nach dem Coamatic® FVIII Test, Chromogenix AB) gemischt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl Substrat (z. B. S 2765, N-a-Cbo-D-Arg-Gly-Arg-pNA) wurde die Reaktion nach einer bestimmten Inkubationsdauer durch Zugabe von 50 µl Essigsäure (50%) gestoppt und die OD405nm gemessen. Eine FVIII-Standardkurve diente der Ermittlung der Probenkonzentration. 20 25 30

Ergebnis

In einem ersten Ansatz wurde die Inkubationszeit von Protease mit FVIII (2 IU/ml) konstant gehalten (10 min), jedoch die Proteasekonzentration variiert (0,1,1 und 10 µg/ml). Die Reaktion wurde gestoppt und die restliche Konzentration an aktivem FVIII bestimmt. Mit steigender Proteasekonzentration wurde entsprechend mehr FVIII inaktiviert (Abb. 1).

Mit Hilfe einer entsprechenden Standardkurve lässt sich der Proteasegehalt einer Probe quantifizieren.

In einem zweiten Ansatz wurde die Proteasekonzentration konstant gehalten (10 µg/ml), jedoch die Inkubationszeit mit FVIII (2 IU/ml) variiert. Mit zunehmender Inkubationsdauer zeigte sich eine deutliche Reduktion der verbleibenden Konzentration an aktivem FVIII (Abb. 2).

Beispiel 5

Der Einfluß des "FVII-Aktivators" auf die Faktor V Aktivität wurde untersucht:
25 µl protease-haltige Lösung (0–100 µg/ml) wurde mit 50 µl FV (5 IU/ml) und 25 µl 25 mM CaCl₂ inkubiert (0-20 min) und danach mit 400 µl Puffer enthaltend 100 KIE/ml Aprotinin versetzt.

Je 100 µl eines jeden Inkubationsansatzes wurden dann mit 100 µl FV-Mangelplasma für 1 min bei 37°C inkubiert, mit 200 µl Thromborel S® gemischt und die Gerinnungszeiten im Koagulometer nach Schnitger und Gross bestimmt. Die Restaktivitäten des FV wurden ermittelt.

Ergebnis

| Protease Konzentration (µg/ml) | Restaktivität FV Inkubationszeit von Protease mit FV (min) | | | 55 |
|-----------------------------------|--|----|-----|----|
| | 0 | 10 | 20 | |
| 10 | 93 | 91 | 100 | 60 |
| 30 | 100 | 93 | 28 | |
| 100 | 100 | 29 | 13 | 65 |

Dieses Beispiel zeigt, daß der FV durch die Protease mit der Zeit inaktiviert wurde.

Beispiel 6

Der Einfluß des "FVII-Aktivators" auf die Gerinnungszeiten in sog. Globaltests wurde mit Hilfe von Koagulometern nach Schnitger und Gross untersucht. Alle aufgeführten Differenzwerte entsprechen den um diesen Betrag verkürzten Gerinnungszeiten.

NAPTT (Nicht-aktivierte partielle Thromboplastinzeit)

Die protease-haltige Lösung wurde mit Puffer auf 100 µg/ml, 30, 10 und 3 µg/ml verdünnt. Jeweils 100 µl dieser Lösung wurden mit 100 µl Citrat-Plasma (Standard Human Plasmapool oder Einzelspender) und 100 µl Pathromtin® für 2 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 100 µl 25 mM CaCl₂ versetzt und danach die Gerinnungszeiten ermittelt. Die Differenzen zwischen diesen Meßwerten und den entsprechenden Gerinnungszeiten, die mit Pufferlösung anstelle der Protease ermittelt wurden, wurden bestimmt.

| 15 Probe Nr. | Differenz Gerinnungszeiten (Puffer-Probe) (sec) | | | | |
|--------------|---|---|----|----|-----|
| | Protease Konzentration (µg/ml) | | | | |
| | 0 | 3 | 10 | 30 | 100 |

20

| | | | | | |
|--|---|----|----|----|----|
| 25 Standard Human Plasma (213 sec) | 0 | 13 | 20 | 42 | 43 |
|--|---|----|----|----|----|

30

| | | | | | |
|------|---|----|----|----|----|
| 30 1 | 0 | 20 | 33 | 42 | 41 |
| 2 | 0 | 27 | 31 | 45 | 47 |
| 3 | 0 | 13 | 14 | 23 | 29 |
| 35 4 | 0 | 18 | 37 | 51 | 50 |
| 5 | 0 | 25 | 49 | 54 | 46 |

40

Plasma-Rekalzifizierungszeit

Die protease-haltige Lösung wurde mit Puffer auf 100 µg/ml, 30, 10 und 3 µg/ml verdünnt. Jeweils 100 µl dieser Lösung wurden mit 100 µl Citrat-Plasma (Standard Human Plasmapool oder Einzelspender) für 1 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 100 µl 25 mM CaCl₂ versetzt und danach die Gerinnungszeiten ermittelt. Die Differenzen zwischen diesen Meßwerten und den entsprechenden Gerinnungszeiten, die mit Pufferlösung anstelle der Protease ermittelt wurden, wurden bestimmt.

50

55

60

65

DE 199 03 693 A 1

| Probe Nr. | Differenz Gerinnungszeiten (Puffer-Probe) (sec) | | | | | | 5 |
|---------------------------------|---|------|------|-------|-------|----|---|
| | 0 | 3 | 10 | 30 | 100 | | |
| Standard Human Plasma (283 sec) | 0 | 17,2 | 15,1 | 30,5 | 50,4 | 10 | |
| 1 | 0 | 29,8 | 51,7 | 60,3 | 90,1 | 15 | |
| 2 | 0 | 25,2 | 51,7 | 69,5 | 101,3 | 20 | |
| 3 | 0 | 28,0 | — | 39,0 | 74,6 | 25 | |
| 4 | 0 | 27,3 | 42,7 | 55,6 | 91,8 | | |
| 5 | 0 | 44,3 | 69,1 | 101,2 | 134,2 | | |

PT (Prothrombinzeit)

Die protease-haltige Lösung wurde mit Puffer auf 100 µg/ml, 30, 10 und 3 µg/ml verdünnt. Jeweils 100 µl dieser Lösung wurden mit 100 µl Citrat-Plasma (Standard Human Plasmapool oder Einzelspender) für 1 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 200 µl Thromborel S® (Dade Behring GmbH) versetzt und danach die Gerinnungszeiten ermittelt.

Die Differenzen zwischen diesen Meßwerten und den entsprechenden Gerinnungszeiten, die mit Pufferlösung anstelle der Protease ermittelt wurden, wurden bestimmt.

| Probe Nr. | Differenz Gerinnungszeiten (Puffer-Probe) (sec) | | | | | | 35 |
|----------------------------------|---|-----|-----|-----|-----|----|----|
| | 0 | 3 | 10 | 30 | 100 | | |
| Standard Human Plasma (13,6 sec) | 0 | 1,0 | 1,7 | 1,5 | 2,4 | 40 | |
| 1 | 0 | 0,7 | 1,3 | 2,4 | 2,7 | 45 | 50 |
| 2 | 0 | 0,3 | 0,4 | 1,7 | 3,1 | | |
| 3 | 0 | 0,4 | 0,7 | 1,5 | 1,8 | 55 | |
| 4 | 0 | 0,1 | 0,7 | 1,8 | 3,1 | | |
| 5 | 0 | 0,3 | 0,5 | 1,2 | 2,8 | 60 | |

Die Gerinnungszeiten der genannten Globaltests wurden in einer von der Konzentration der Protease abhängigen Weise verkürzt. Entsprechend liess sich nach "Eichung" eines verwendeten Plasmas mit einer bekannten Menge des "FVII-Aktivators" unter Ablesung von einer Standardkurve die Proteasekonzentration einer Probe ermitteln.

Beispiel 7

Die Plasminogenaktivatoren aktivierenden Eigenschaften des "FVII-Aktivators" wurden an der Einketten-Urokinase (scuPA) und des Einketten-tPA (sctPA) untersucht.

DE 199 03 693 A 1

- Ausatz:
- 0,1 ml PAA-Lösung (20 µg/ml scuPA oder 100 µg/ml sctPA)
 +0,1 ml Test-Puffer oder
 100 U Heparin/ml in Test-Puffer oder
 5 20 mM CaCl₂ im Test-Puffer
 +0,5 ml Test-Puffer
 +0,1 ml Protease/Probe (steigende Konzentrationen:
 2-10 µg/ml scuPA oder
 50-200 µg/ml sctPA)
- 10 Inkubation bei 37°C
 +0,1 ml 100 KIE Aprotinin/ml in Test-Puffer
 Inkubation für 2 min bei 37°C
 ü 0,1 ml Substrat S-2444 (3 mM).
- Als Kontrolle wurde anstelle des Plasminogenaktivators (PA) vor der ersten Inkubation Aprotinin vorgelegt und jeweils mitgeführt. Dafür wurde anstelle des Aprotinin erst später PA zugegeben.
- 15 Die ΔOD_{405nm} wurde photometrisch bestimmt. Die ermittelten Kontroll-Werte wurden von den Proben/Proteasewerten abgezogen und so die durch die PAA Aktivität verursachte PA-Aktivität in mIU/min) bestimmt.

Ergebnis

| | | | |
|----|--|--|-----|
| 20 | scuPA-Aktivierung (20 µg/ml scuPA 2-10 µg/ml "FVII-Aktivator") | | |
| | A. Stimulanz: ohne | | |
| 25 | Inkubationszeit (min) | resultierende PA-Aktivität (Δ mIU/min) "FVII-Aktivator" (µg/ml) | |
| | | 2 | 5 |
| 30 | | 10 | |
| | 2 | 25 | 60 |
| 35 | 5 | 79 | 179 |
| | 10 | 186 | 449 |
| 40 | B. Stimulanz: Heparin | | |
| | Inkubationszeit (min) | resultierende PA-Aktivität (µ mIU/min) "FVII-Aktivator" (µg/ml) | |
| 45 | | 2 | 5 |
| | | 10 | |
| 50 | 2 | 190 | 332 |
| | 5 | 330 | 455 |
| 55 | 10 | 417 | 462 |
| 60 | | | |
| 65 | | | |

DE 199 03 693 A 1

B. Stimulanz: CaCl_2

| Inkubationszeit (min) | resultierende PA-Aktivität ($\Delta \text{mIU/min}$) | | | 5 |
|--------------------------|--|-----|-----|----|
| | 2 | 5 | 10 | |
| 2 | 255 | 370 | 401 | 10 |
| 5 | 338 | 424 | 438 | |
| 10 | 416 | 445 | 448 | 15 |

Die Tabellen veranschaulichen, daß scuPA in einer von der Konzentration des "FVII-Aktivators" und der Inkubationsdauer abhängigen Weise aktiviert wurde. Dabei wirkten sowohl Heparin als auch Kalzium stimulierend auf die durch die Protease verursachte Aktivierung des PA.

sctPA-Aktivierung (100 $\mu\text{g/ml}$ sctPA, 50–200 $\mu\text{g/ml}$ "FVII-Aktivator")

Da die Umsatzrate des aktivierte tPA gegenüber dem tPA-Proenzym lediglich um den Faktor 3–4 zunimmt, (die der uPA jedoch um das 1.000–1.500-fache), müssten höhere Konzentrationen beider Reaktionspartner (siehe oben) gewählt werden, um ein auswertbares Messignal zu erhalten.

| Inkubationszeit (min) | resultierende PA-Aktivität ($\Delta \text{mIU/min}$) |
|--------------------------|--|
| | "FVII-Aktivator" (200 $\mu\text{g/ml}$) |
| 1 | 10,2 |
| 2 | 16,8 |
| 5 | 38,8 |
| 10 | 60,2 |
| 20 | 73,3 |

B. Abhängigkeit von der Konzentration des "FVII-Aktivators" (Inkubationszeit: 20 min 37°C), Stimulanz: Heparin (100 IU/ml)

| "FVII-Aktivator" ($\mu\text{g/ml}$) | PA-Aktivität ($\Delta \text{mIU/min}$) |
|--|--|
| 50 | 33,6 |
| 100 | 51,0 |
| 200 | 71,9 |

DE 199 03 693 A 1

C. Stimulanz (Inkubationsdauer: 20 min bei 37°C)

| Stimulanz | PA-Aktivität (Δ mIU/mln) |
|--------------------|----------------------------------|
| 5 ohne | 5,9 |
| 10 CaCl_2 | 25,3 |
| 15 Heparin | 63,8 |

Die Tabellen demonstrieren, daß auch sctPA in einer von der Konzentration der Protease und der Inkubationszeit abhängigen Weise aktiviert wurde. Sowohl Heparin als auch Kalziumionen hatten eine stimulierende Wirkung auf den "FVII-Aktivator" hinsichtlich seiner PA-Aktivierung.

Beispiel 8

20 Zwei FVIII enthaltende Lösungen, die eine im wesentlichen frei von von Willebrand Faktor und die andere vWF-haltig, wurden mit der obengenannten Protease in Gegenwart von Kalzium inkubiert. Nach bestimmten Zeiten wurden die restlichen FVIII-Aktivitäten mittels eines chromogenen Testes bestimmt und in Relation zu den Kontrollansätzen ohne Protease gesetzt.

Dazu wurden 25 μl einer 0,1 IU/ml FVIII enthaltenden Lösung mit dem gleichen Volumen der Proteaselösung (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) versetzt und mit 25 μl CaCl_2 (25 mM) gemischt. Nach Inkubationsdauern von 0, 5, 10 und 20 min bei 37°C wurden die Ansätze mit je 400 μl einer 200 KIE/ml Aprotinin enthaltenden Lösung versetzt, um die proteolytische Aktivität der Protease zu stoppen. Vorversuche hatten gezeigt, daß diese Aprotinin-Konzentration keinen wesentlichen störenden Einfluß auf den nachfolgend beschriebenen FVIII-Aktivitätstest hatte (Ansätze 1+3). In Ansatz 2 wurde die Protease vor Kontakt mit FVIII mit Aprotinin inkubiert und danach verfahren wie oben beschrieben.

30 Je 50 μl der gestoppten Probe (bzw. nach weiterer Verdünnung) wurden danach mit dem sog. Faktorenreagenz, im wesentlichen bestehend aus FXA, FX und einem Thrombininhibitor versetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 50 μl eines chromogenen Substrates, das durch aktivierte FX gespalten wird, wurde die Reaktion nach 5 minütiger Inkubation durch Zugabe von 50 μl Essigsäure (50%) gestoppt und die delta OD_{405nm} quantifiziert. Die FVIII Aktivität (mIU) wurde anhand einer Standardkurve, die mit Hilfe einer mitgeführten Verdünnungsreihe des FVIII-Konzentrates erstellt wurde, ermittelt.

Die FVIII-Aktivitäten sind in Prozent der nicht mit Protease versetzten Kontrollen dargestellt.

| Ansatz | Ergebnis | | | |
|-----------------------------|------------------------|----|----|----|
| | FVIII-Aktivität (%) | | | |
| | Inkubationsdauer (min) | 0 | 5 | 10 |
| 45 1. FVIII | 97 | 27 | 11 | <1 |
| 50 2. FVIII/Aprotinin | 98 | 97 | 97 | 96 |
| 55 3. FVIII/vWF | 98 | 16 | 14 | 1 |

In Gegenwart von CaCl_2 (hier 6,25 mM) wurde FVIII durch die Protease in einer von der Inkubationsdauer abhängigen Weise inaktiviert. Der vWF schützte den FVIII nicht vor Inaktivierung durch die Protease. Die Inhibition der Protease mit Aprotinin vor Kontakt mit FVIII verhinderte dessen Inaktivierung.

Beispiel 9

55 Diese Versuchsreihe wurde durchgeführt wie in Beispiel 1/Ansatz 1 beschrieben, jedoch wurden hier die Kalziumkonzentrationen in den Mischungen aus Protease und FVIII variiert. Dazu wurde aus der Kalzium-Stammlösung CaCl_2 zu gegeben bis zu den in der Abb. 3 dargestellten Endkonzentrationen.

Ergebnis

60 Wird die Kalziumkonzentration im Ansatz unter 1 mM gesenkt, werden unter diesen Bedingungen ca. 50% des FVIII verschont. Unter 0,5 mM Kalzium sind es bereits mehr als 60% (Abb. 1).

DE 199 03 693 A 1

Beispiel 10

Der Einfluss des "FVII-Aktivators" auf die Gerinnungszeiten in sog. Globaltests wurde mit Hilfe der Thrombelastographie untersucht.

Mit einem TEG-Meter (Fa. Hellige) nach Hilgard wurde die Änderung der Scherelastizität bzw. die Festigkeit des entsprechenden Blutgerinnsels fortlaufend registriert. Bei den sog. r-, bzw. k-Werten handelt es sich um die Zeiten vom Beginn der Blutabnahme bzw. dem Start der Gerinnungsreaktion, bei Citrat-Blutplasma um den Zeitpunkt der Rekalzifizierung bis zur Verbreiterung der TEG-Kurve um 1 mm bzw., die Zeit vom Endpunkt des r-Wertes bis zur Verbreiterung der Kurve auf 20 mm (Gerinnungsbildungszeit).

Dazu wurden 150 µl Blut oder Plasma vom 5 Spendern jeweils in den Messküvetten bei 37°C für 2 min inkubiert und danach 50 µl Probe (Protease) zugemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 25 mM CaCl₂ gestartet. Die Endkonzentration des "FVII-Aktivators" im Ansatz betrug 30 µg/ml. Die Verkürzung der r-Zeit wurde in Relation zum Ansatz gemessen, der anstelle der Probe Puffer enthielt.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 199 03 693 A 1

| | | | Ergebnis | | |
|------|------------|----------|-----------------|-----------------|-------------------|
| | Blut Nr. | Probe | r-Zeit (min) | k-Zeit (min) | r+k-Zeit (min) |
| 5 | 1 | Protease | 5,2 | 3,4 | 8,6 |
| | 10 | Puffer | 7,8 | 5,6 | 13,4 |
| 10 | 2 | Protease | 5,2 | 5,1 | 10,3 |
| | 15 | Puffer | 6,8 | 7,1 | 13,9 |
| 15 | 3 | Protease | 4,0 | 5,2 | 9,2 |
| | 20 | Puffer | 6,5 | 6,3 | 12,8 |
| 20 | 4 | Protease | 4,5 | 4,8 | 9,3 |
| | 25 | Puffer | 4,8 | 6,0 | 10,8 |
| 25 | 5 | Protease | 4,2 | 3,8 | 8,0 |
| | 30 | Puffer | 7,0 | 5,8 | 12,8 |
| | | | | | |
| 35 | Plasma-Nr. | Probe | r-Zeit (min) | | |
| 35 | 1 | Protease | 9,0 | | |
| | 1 | Puffer | 11,3 | | |
| 40 | 2 | Protease | 9,2 | | |
| | 2 | Puffer | 12,5 | | |
| 45 | 3 | Protease | 9,5 | | |
| | 3 | Puffer | 9,6 | | |
| 50 | 4 | Protease | 8,2 | | |
| | 4 | Puffer | 12,1 | | |
| 55 | 5 | Protease | 9,7 | | |
| | 5 | Puffer | 14,1 | | |

Dieses Beispiel verdeutlicht, dass die Zugabe der Protease in fast allen Fällen eine deutliche Verkürzung der Gerinnungszeit zur Folge hatte. Die fibrinolytischen Eigenschaften des "FVII-aktivators" traten hier in den Hintergrund. Ein Grund dafür ist, dass in "Normalpersonen" die Plasminogenaktivator-Konzentrationen im Plasma im Nanogramm-Bereich liegen und in dem in-vitro Gerinnungstest nicht zum Tragen kommen.

Beispiel 11

Die FVIII "Bypassing Acitivity" der Protease wurde durch folgenden Versuchsanansatz demonstriert: Als Messtechnik diente die Thrombelastographie. Ausgewertet wurde die r-Zeit (siehe Beispiel 10). Eine Vollblutprobe wurde mit einem monoklonalen Antikörper, dessen FVIII-Aktivität inhibierende Eigenschaften bekannt waren, inkubiert, um die Anwesenheit eines natürlich vorkommenden FVIII-Inhibitors (Antikörper gegen FVIII) zu simulieren. Diese Probe wurde verglichen mit der Vollblutproben-Kontrolle (Puffer anstelle von mAb). Die FIB-Aktivität der Protease wurde durch Zusatz der Protease (Endkonzentration 17 µg/ml) zu der durch den mAb inhibierten Vollblutprobe getestet. Einer weiteren

DE 199 03 693 A 1

Probe wurde Protease zugegeben und deren alleiniger Einfluss auf die r-Zeit ermittelt.

Ergebnis

| | r-Zeit | |
|---------------------------|--------|----|
| Vollblut-Kontrolle | 8,0 | 5 |
| Vollblut + mAb | 11,0 | |
| Vollblut + mAb + Protease | 8,0 | |
| Vollblut + Protease | 3,5 | |
| | | 10 |

Die Verlängerung der r-Zeit, die durch den anti-FVIII-mAb verursacht wurde, wurde durch die Anwesenheit der Protease wieder normalisiert, was die FEIB-Aktivität der Protease veranschaulichte. Die Protease allein bewirkte eine Verkürzung der Gerinnungszeit, wie schon oben gezeigt.

Die Ergebnisse sind in den Beispielen 12 und 13 enthalten.

15

Beispiel 12

Einer Lösung, die 50 µg/ml der FVII-aktivierenden Protease enthielt, wurden folgende Substanzen auf die entsprechenden Endkonzentrationen zugesetzt:

20

25 mM Na-Citrat

25 mM HEPES

100 mM Arginin

0,75 g/ml Saccharose.

25

Die Lösung wurde portioniert und die Aliquots wurden jeweils auf unterschiedliche pH-Werte von 5,0 bis 8,6 eingestellt und anschließend für 10 Stunden bei 60°C erhitzt.

Die Aktivitäten der erhitzten Proteaselösungen wurden in einem chromogenen Test bestimmt, wobei die zeitabhängige Amidolyse des chromogenen Substrates S2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pHAX2 HCl, Chromogenix AB, Schweden) registriert wurde. Diese Aktivität wurde als Prozent der parallel gemessenen, nicht erhitzten Aliquots ausgedrückt:

30

Resultat

| Ausatz | Aktivität (%) | |
|------------------|---------------|----|
| Ausgangsmaterial | 100 | |
| pH 5,0 | 76 | 35 |
| pH 5,5 | 65 | |
| pH 6,1 | 81 | |
| pH 6,5 | 50 | |
| pH 7,1 | 43 | |
| pH 7,5 | 46 | 40 |
| pH 8,1 | 46 | |
| pH 8,6 | 32 | |

Diese Versuchsreihe verdeutlicht, dass die Stabilisierung besonders im saurem pH-Bereich die Inaktivierung der Protease deutlich reduziert hat. Der leichte "Einbruch" bei pH 5,5 lässt sich dadurch erklären, dass der isoelektrische Punkt der Protease in diesem Bereich liegt. Na-Citrat verhindert, dass ein Aktivitätsverlust >50% im bevorzugten pH-Bereich eintritt.

45

Beispiel 13

50

Der Ansatz bei pH 6,1 (Beispiel 1) zeigte die beste Stabilisierung der Protease. Entsprechend wurden bei pH 6,0 verschiedene Zusätze getestet und entsprechend Beispiel 1 ausgewertet:

Folgende Endkonzentrationen wurden bei einer Konzentration der Protease von 50 µg/ml eingestellt:

55

50 mM Na-Citrat/50 mM NaCl, pH 6,0

0,75 g/ml Saccharose

100 mM Glycin

100 mM Arginin

55

Resultat

60

| Ansatz | Aktivität (%) | |
|-----------------------------------|---------------|----|
| Ausgangsmaterial | 100 | |
| Na-Citrat/NaCl | 54 | |
| Na-Citrat/NaCl/Saccharose | 85 | 65 |
| Na-Citrat/NaCl/Saccharose/Glycin | 92 | |
| Na-Citrat/NaCl/Saccharose/Arginin | 97 | |

DE 199 03 693 A 1

Eine deutliche Stabilisierung der Protease durch Zusatz von Saccharose und jeweils einer Aminosäure wurde gezeigt.

Patentansprüche

- 5 1. Protease zur Aktivierung des Blutgerinnungsfaktors VII, dadurch gekennzeichnet, daß sie
 - a) durch die Anwesenheit von Aprotinin gehemmt wird,
 - b) durch Calcium-ionen und/oder Heparin oder Heparin-verwandte Substanzen in ihrer Aktivität gesteigert wird und
 - c) in der SDS-PAGE bei anschließender Färbung im nicht-reduzierten Zustand eine oder mehrere Banden im Molekulargewichtsbereich von 50–75 kDa und im reduzierten Zustand eine Bande bei 40–55 kDa und eine oder mehrere Banden im Molekulargewichtsbereich von 10–35 kDa aufweist.
- 10 2. Protease nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in der SDS-PAGE im reduzierten Zustand im Molekulargewichtsbereich 60–65 kDa und von 40–55 kDa gewonnene Bande eine Aminosäuresequenz von LLESLDP und die im Molekulargewichtsbereich von 10–35 kDa gewonnene Bande eine Aminosäuresequenz von IYGGFK-STAGK aufweist.
- 15 3. Protease nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch Fraktionierung von Blutplasma oder von Prothrombinkomplex(PPSB)-Konzentraten gewonnen wird.
4. Proenzym der Protease nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie in der SDS-PAGE im reduzierten Zustand eine Bande im Molekulargewichtsbereich zwischen 60 und 65 kDa aufweist und die Aminosäuresequenzen LLESLDP und IYGGFKSTAGK enthält.
- 20 5. Verfahren zur Gewinnung der Protease gemäß den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Blutplasma oder Prothrombinkomplex (PPSB)-Konzentraten nach vorangegangener Anionenaustauscher-Chromatographie mittels einer Affinitätschromatographie unter Verwendung von Heparin oder einer dem Heparin verwandten Substanz oder Dextransulfat gewonnen wird.
- 25 6. Reagenz zum immunoologischen Nachweis der Protease der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es einen polyklonalen oder monokonalen Antikörper gegen die Protease enthält.
7. Reagenz zum Nachweis von Faktor VII, dadurch gekennzeichnet, daß es die Protease der Ansprüche 1 bis 3, ggf. zusammen mit Protease-Aktivatoren enthält.
- 30 8. Testsystem zum qualitativen und quantitativen Nachweis einer Protease nach Anspruch 1 oder ihres Proenzymes nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Protease gemessen wird durch
 - a) ihre Blutgerinnungsfaktoren VIII/VIIa oder V/Va inaktivierende Wirkung oder
 - b) ihre Blutgerinnungszeiten verkürzende Wirkung in globalen Gerinnungstests oder
 - c) ihre Plasminogen-Aktivatoren aktivierende Wirkung
 - d) ihre den FVII aktivierende Wirkung.
- 35 9. Testsystem nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die die Blutgerinnungszeiten verkürzende Wirkung bestimmt wird mittels der
 - a) nicht-aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (NAPTT) oder der
 - b) Prothrombinzeit (PT) oder der
 - c) Plasma-Rekalifizierungszeit oder der
 - d) aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (APTT).
- 40 10. Testsystem nach Ansprüchen 8 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß die die Plasminogen-Aktivatoren aktivierende und/oder verstärkende Wirkung gemessen wird durch die Aktivierung der
 - a) Einketten-Urokinase (scuPA, single chain urokinase plasminogen activator) oder der
 - b) Einketten-tPA (scfPA, single chain tissue plasminogen activator).
- 45 11. Testsystem nach Ansprüchen 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß es Kalziumionen in einer Menge von mehr als 0,001 mM, vorzugsweise in einer Menge von mehr als 0,005 mM, enthält.
12. Testsystem nach den Ansprüchen 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die die Plasminogen-Aktivatoren verstärkende Wirkung
 - a) mit einem chromogenen Test oder
 - b) in einer gekoppelten Reaktion in Anwesenheit von Plasminogen gemessen wird, wobei die Plasminbildung selbst oder die durch Plasmin bewirkte Auflösung eines Fibringerinnseins bestimmt wird.
- 50 13. Stabilisiertes Faktor V- und stabilisiertes Faktor VIII-Präparat, dadurch gekennzeichnet, daß sie von den durch proteolytischen Abbau entstehenden, inaktiven Faktor VII und Faktor V-Fragmenten durch die Inhibition der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease frei sind.
- 55 14. Stabilisiertes Präparat nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß zur Inhibition der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease die Konzentration an Kalziumionen im Faktor VIII oder im Faktor V-Präparat weniger als 1,0 mM, vorzugsweise weniger als 0,5 mM beträgt.
15. Stabilisiertes Präparat nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die FVIII- bzw. FV-haltige Lösung mit immobilisiertem Heparin, immobilisierten heparin-ähnlichen Substanzen oder immobilisiertem Dextransulfat in Kontakt gebracht und dadurch eine ganz oder teilweise von Protease/Proenzym befreite Lösung gewonnen worden ist.
- 60 16. Stabilisiertes Präparat nach den Ansprüchen 14 und 15, dadurch gekennzeichnet, daß es gegen den proteolytischen Abbau durch den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierende Protease durch den Zusatz eines natürlichen oder synthetischen Protease-Inhibitors geschützt ist.
- 65 17. Stabilisierte Lösung der Protease oder des Proenzyms nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch Zugabe eines Puffers auf einen pH-Wert auf 4,0 bis 9,0 eingestellt ist und/oder Ethylenglykol oder Glyzerin in einer Menge von 5–80 Gew.-% enthält.
18. Pharmazeutische Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine zur Auflösung von fibrinhaltigen Throm-

DE 199 03 693 A 1

- ben ausreichende Menge der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease und/oder ihr Proenzym enthält.
19. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass sie ausser der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease und/oder ihrem Proenzym Einketten- oder Zweiketten-Plasminogenaktivatoren (PA) und/oder Antikoagulantien enthält. 5
20. Pharmazeutische Zubereitung nach den Ansprüchen 18 und 19, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich lösliche Kalziumsalze und/oder Heparin oder heparin-ähnliche Substanzen enthält.
21. Pharmazeutische Zubereitung zur Verminderung der Gerinnungsfähigkeit des Blutes, dadurch gekennzeichnet, daß sie zur Inhibition der Protease und/oder ihres Proenzymes gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 einen Proteasehemmer wie Aprotinin enthält.
22. Verfahren zur Herstellung einer die Proenzym gemäß den Ansprüchen 1-4 enthaltenden pharmazeutischen Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, dass die Zubereitung 10
bereitung, a) in einem pH-Bereich von 3,5 bis 8,0
b) unter Zusatz einer oder mehrerer Aminosäuren in einer Menge von
 $>0,01 \text{ mol/l}$ und/oder
c) unter Zusatz eines Zuckers oder einer Kombination mehrerer Zucker in einer Gesamtmenge von > 15
 $0,05 \text{ g/ml}$ und/oder
d) unter Zusatz einer oder mehrerer Substanzen, die Calcium-ionen zu komplexieren vermögen unter Pasteurisierungs-Bedingungen hergestellt wird.
23. Pharmazeutische Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach dem Verfahren gemäß Anspruch 22 erhältlich ist. 20
24. Verwendung der aus Blutplasma, Prothrombin-Komplex(PPSB)Konzentraten hergestellten oder rekombinant oder transgen exprimierten Protease oder ihres Proenzymes gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 zur Förderung der Wundheilung und der Blutstillung, als Zusatz eines auf Fibrinbasis zum raschen Wundverschluß geeigneten Fibrinklebers, zur Substitution bei angeborenen oder erworbene Mängelzuständen an dieser Protease oder ihrem Proenzym, beim Vorliegen von Antikörpern gegen den Blutgerinnungsfaktor VIII oder zur in vitro-Aktivierung von Faktor VII. 25

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

30

35

40

45

50

55

60

65

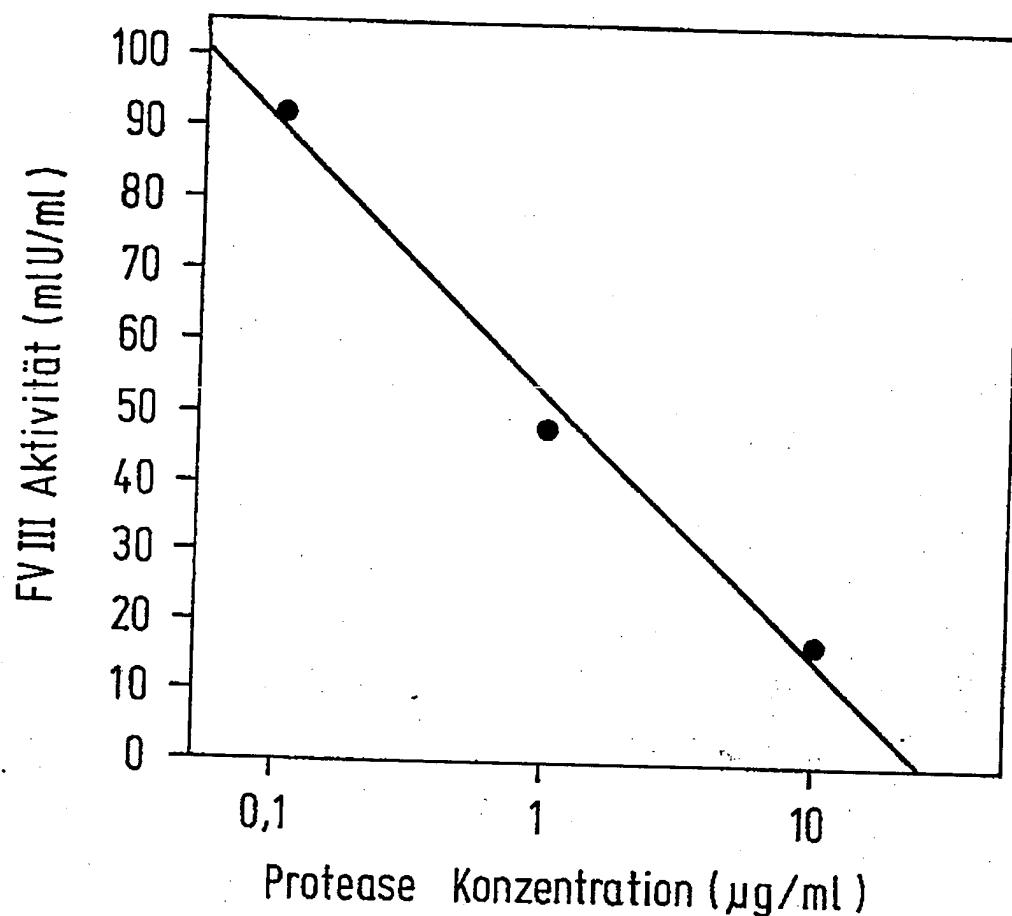
Abbildung 1

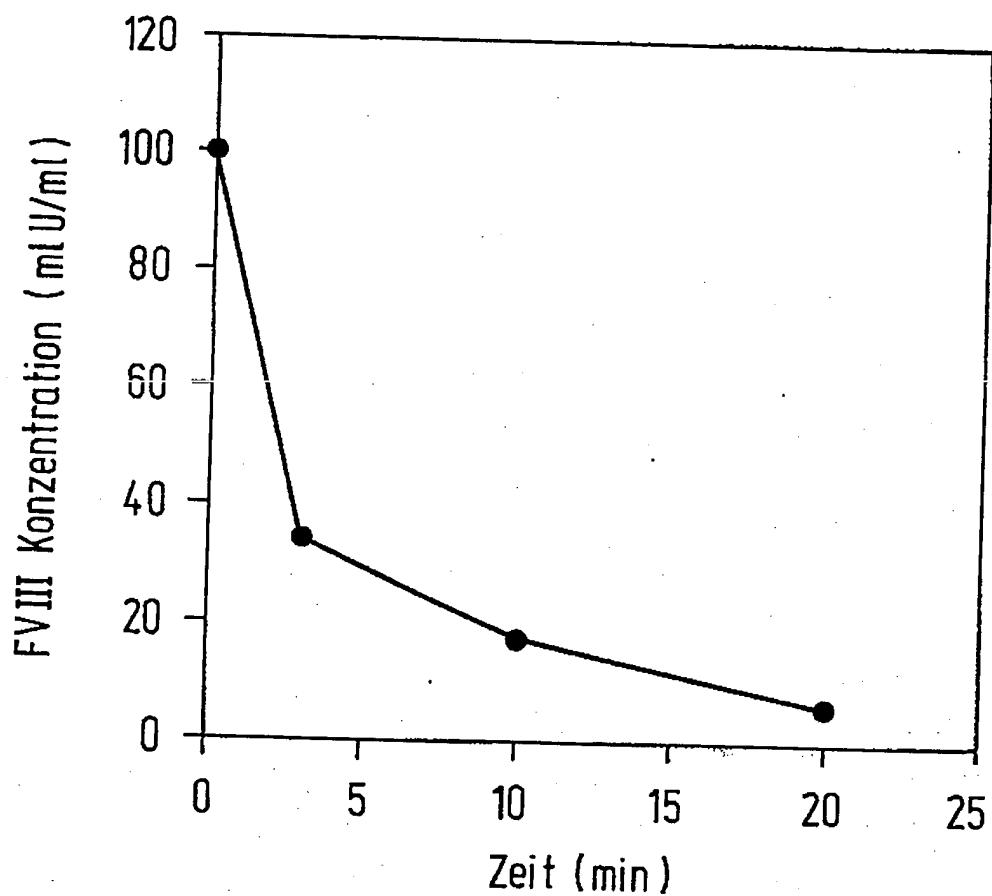
Abbildung 2

Abbildung 3